UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Conrado Milani Coutinho

“Diagnóstico do fator RhD utilizando a reação em
cadeia da polimerase convencional”

Ribeirão Preto

2008

Conrado Milani Coutinho

“Diagnóstico do fator RhD utilizando a reação em cadeia
da polimerase convencional”

“Diagnosis of the RhD status using conventional
polymerase chain reaction”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.
Opção: Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Duarte

Ribeirão Preto

2008

Coutinho, Conrado Milani.

Diagnóstico do fator RhD utilizando a reação em cadeia da polimerase convencional / Conrado Milani Coutinho; Orientador Prof. Dr. Geraldo Duarte. Ribeirão Preto, 2008.

78p. il.; 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Duarte, Geraldo.

Título em inglês: Diagnosis of the RhD status using conventional polymerase chain reaction.

1- PCR convencional, 2- Fator RhD, 3 – Diagnóstico pré-natal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Conrado Milani Coutinho.

Diagnóstico do fator RhD utilizando a reação em cadeia da polimerase convencional.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Opção: Tocoginecologia.

Aprovada em ____ de _____ de _____.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

À minha esposa Karina, pela compreensão, apoio e amor dedicado, aos meus pais Tadeu e Marlene, pela orientação e por serem exemplos de vida e dedicação aos seus filhos, e aos meus irmãos Diego e Larissa, pelo companheirismo motivador.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida e apoio, por ter me dado a disposição necessária para a busca de meus ideais.

A todos os membros das famílias Milani, Coutinho, Pimont e Ferraz, pelo apoio encorajador, pelo empenho em me auxiliar sempre que necessário e pela confiança no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Geraldo Duarte, um raro exemplo de conhecimento, dedicação, disponibilidade e amizade. Enfim, um exemplo de profissional e orientador a ser seguido.

À Profa. Dra. Ester Silveira Ramos, pela paciência, disponibilidade e pela contribuição no desenvolvimento deste projeto. Não hesito em afirmar que, sem seu apoio, nada teria sido possível.

Ao Prof. Dr. José Carlos Peraçoli, pelas sugestões de aperfeiçoamento e pela disponibilidade de participação na banca examinadora.

A todo o corpo docente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial aos membros do Setor de Obstetrícia, professores Aderson Tadeu Berezowski, Reinaldo Rodrigues, Silvana Maria Quintana e Ricardo de Carvalho Cavalli, pela acolhida e credibilidade confiada.

Aos Professores Jurandyr Moreira de Andrade e seu sucessor Antônio Alberto Nogueira, pela representação e dedicação à pós-graduação.

A todos os médicos assistentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São

Paulo, grupo que tenho o orgulho de participar, pela amizade e incentivo em todas as horas.

Aos amigos pessoais que sempre me acompanharam, numerosos demais para citar individualmente, pela amizade e carinho em todos os momentos. Vocês foram fundamentais para a formação do meu caráter e conduta pessoal e profissional.

Aos companheiros da pós-graduação da Ginecologia e Obstetrícia e da Genética, em especial à Flávia Cappello Donabela e ao Murilo Racy Soares. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria sido possível.

Aos médicos residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela contribuição na coleta de material para esta pesquisa e pelo amigável convívio diário.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, do Bloco C do Departamento de Genética e da Pós-Graduação, pela convivência, pelo valioso trabalho e pela amizade.

Aos funcionários do Centro Obstétrico, da enfermaria, do ambulatório e da Mater, pelo companheirismo profissional.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela calorosa acolhida e pela abertura de horizontes na minha caminhada.

Às pacientes e a seus filhos, pela cooperação e gratidão, principais responsáveis e motivo deste trabalho.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, berço da minha formação profissional.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, inclusive àqueles que, por lapso de memória, gostaria de ter agradecido, mas deixei de fazê-lo.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	17
1.1. O antígeno Rh	18
1.2. Isoimunização Rh	20
1.3. O diagnóstico pré-natal.....	23
1.4. DNA fetal proveniente das células fetais na circulação materna	24
1.5. DNA fetal livre na circulação materna.....	25
2- JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO	28
3- HIPÓTESES.....	30
4- OBJETIVOS	32
5- CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
5.1. Critérios de inclusão	35
5.2. Critérios de exclusão	35
5.3. Amostragem	35
5.4. Local de realização	35
5.5. Métodos	36
5.5.1. Coleta da amostra e extração de DNA	36
5.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
5.5.3. Análise estatística.....	40
6- RESULTADOS.....	44
7- DISCUSSÃO	52
8- CONCLUSÃO	60
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

APÊNDICES.....	73
Apêndice A – Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	74
Apêndice B – Questionário.....	75
Apêndice C – Matriz de confusão utilizada na análise estatística	76
ANEXO.....	77
Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HCFMRP-USP	78

RESUMO

COUTINHO, C.M. Diagnóstico do fator RhD utilizando a reação em cadeia da polimerase convencional. 2008. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A aplicação dos métodos de biologia molecular tem acrescentado benefícios aos métodos convencionais de diagnóstico do grupo sanguíneo *Rhesus* (Rh). Alguns estudos evidenciaram a superioridade prática da genotipagem *RhD* por reação em cadeia da polimerase (PCR) em relação às técnicas de identificação do fenótipo dos antígenos do grupo Rh obtidas pela hemaglutinação. Esta análise molecular tem sido realizada utilizando-se várias seqüências cromossômicas e diferentes tipos de técnicas. O grupo Rh contém dois genes homólogos, um codificando o antígeno D e o outro os antígenos C/c e E/e. Os objetivos deste projeto foram: (1) Detectar a presença de seqüência *RhD* específica dos indivíduos Rh positivo; (2) Comparar a presença/ausência destas seqüências com o grupo sanguíneo detectado pela hemaglutinação e calcular a sensibilidade e a especificidade da PCR. Para cumprir estes objetivos, foram analisadas amostras de DNA extraídas de sangue periférico de 23 indivíduos (4 homens e 19 mulheres) Rh positivo (11) e negativo (12) para amplificação de seqüências dos genes *RhD* e *RhCE* utilizando a técnica de PCR convencional. Nestas amostras, a comparação dos resultados da PCR com os da hemaglutinação demonstrou total concordância entre os testes. A sensibilidade do método foi avaliada pela realização da PCR em amostras de sangue Rh positivo diluídas em água e em sangue Rh negativo, amplificando o DNA na concentração de até 4 pg/ μ l. Estes resultados indicaram que a técnica de PCR mostrou-se efetiva no diagnóstico da genotipagem do fator Rh, vislumbrando-se a possibilidade de sua utilização em outros tecidos de origem embrio-fetal para orientação de diagnóstico fetal invasivo e do uso profilático da imunoglobulina anti-D apenas nos casos de incompatibilidade Rh materno-fetal. Adicionalmente, indicaram que havendo melhora da sensibilidade desta técnica será possível detectar quantidades objetivamente menores de DNA fetal na circulação materna, fundamentando um importante passo rumo ao diagnóstico do fator Rh fetal por técnica não invasiva.

Palavras-chave: PCR convencional, Fator RhD, Diagnóstico pré-natal.

ABSTRACT

COUTINHO, C.M. Diagnosis of the RhD status using conventional polymerase chain reaction. 2008. 78 p. Dissertation (Master's degree) – Medicine School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Molecular biology techniques have added some advantages to conventional diagnosis of the *Rhesus* (Rh) blood group. Many researches have demonstrated the practical superiority of *RhD* genotyping using polymerase chain reaction (PCR) over phenotypic identification tests obtained by hemagglutination. The use of different kinds of molecular analysis techniques and genetic sequences has been described. The Rh blood group contains two homologous genes, one encoding the D antigen and the other one coding C/c and E/e antigens. This study objectives were: (1) Detect the *RhD* sequence specific for the Rh positive individuals; (2) Compare the presence/absence of these sequences with the blood group identified by hemagglutination to calculate PCR's sensitivity and specificity rates. To accomplish these objectives, DNA extracted from venous blood of 23 individuals (4 men and 19 women), Rh positive (11) and negative (12), were analyzed using conventional PCR to amplify *RhD* and *RhCE* gene sequences. The comparison of PCR with hemagglutination results has shown total agreement. The sensitivity of this PCR method was evaluated using progressive dilutions of Rh positive samples on water and also on Rh negative samples, which demonstrated successful amplification of until 4 pg/μl DNA concentration. These results have indicated that PCR was effective for the *RhD* genotyping, foreseeing the possibility of its utilization with other embryo-fetal tissues for invasive diagnosis orientation and anti-D immunoglobulin use only in cases of maternal-fetal incompatibility. Also, with an increase of this technique's sensitivity, fewer DNA amounts could be detected, which will certainly be an important step towards noninvasive fetal *RhD* diagnosis.

Keywords: Conventional PCR, RhD factor, Prenatal diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama dos genes Rh e seus dois haplótipos mais comuns, correspondendo a indivíduos *RhD* positivo e negativo.

Figura 2. Representação esquemática do *locus* Rh no cromossomo 1. Os indivíduos *RhD* positivo podem ser homo ou heterozigotos para o gene *RhD*, enquanto os *RhD* negativo são caracterizados pela deleção deste gene.

Figura 3. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb demonstrando as bandas correspondentes a 100, 200 e 300 pb; colunas (1) e (3) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; colunas (2) e (4) DNA extraído de sangue de pacientes Rh negativo.

Figura 4. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR para a região do intron 4 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb; colunas (1), (2), (3) e (5) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; coluna (4) DNA extraído de sangue de paciente Rh negativo.

Figura 5. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR de amostras de DNA diluídas em água para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb; as colunas (100), (50), (25), (10), (5) e (1) demonstram as concentrações em ng/μl das diluições do DNA extraído de sangue em água; a coluna (100 pg) demonstra a concentração de 100

pg/μl obtida pela diluição do DNA extraído de sangue em água; (+) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; (-) DNA extraído de sangue de pacientes Rh negativo; (B) Controle interno branco, sem DNA.

Figura 6. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR de amostras de DNA positivo diluídas em DNA negativo para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb demonstrando as bandas correspondentes a 100 e 200 pb; colunas (100%), (0%), (50%), (25%), (10%), (5%) e (1%) Diluições do DNA extraído de sangue Rh positivo em DNA extraído de sangue Rh negativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* para as seqüências do intron 4 e exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*.

Tabela 2. Tabela da matriz de confusão utilizada para a realização da análise estatística.

Tabela 3. Resultados da amplificação de seqüências do intron 4 e exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE* comparados com o resultado da sorotipagem do sangue do grupo de estudo.

Tabela 4. Diluições do DNA Rh positivo e as concentrações utilizadas para determinar a sensibilidade na PCR.

Tabela 5. Diluições progressivas do DNA Rh positivo em DNA Rh negativo e as concentrações disponíveis de DNA para a PCR.

Tabela 6. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da PCR para genotipagem *RhD*.

Tabela 7. Análise estatística da performance da PCR convencional em comparação com os resultados da hemaglutinação para a detecção do fator Rh.

LISTA DE ABREVIATURAS

BD - Do inglês *Beckton-Dickinson*

BVC - Biópsia de vilosidades coriônicas

CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DUM - Data da última menstruação

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

FIV - Fertilização *in vitro*

HAC - Hiperplasia Adrenal Congênita

HCFMRP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

ICSI - Injeção Intra Citoplasmática de Espermatozóide

IG - Idade gestacional

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

NaCl - Cloreto de sódio

pb - Pares de bases

PCR - Do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

RA - Reprodução assistida

rpm - Rotações por minuto

SUS - Sistema Único de Saúde

TE - Transferência de embriões

US - Ultra-sonografia

UBS - Unidade Básica de Saúde

USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

μL - Microlitro

mL - Mililitro

M - Molar

mM - Milimolar

% - Porcentagem

s - Segundo

U - Unidade

1 - INTRODUÇÃO

1.1. O antígeno Rh

O grupo sanguíneo Rh de cada indivíduo é determinado por dois genes adjacentes que foram mapeados no cromossomo 1 (1p34-36): o que codifica o antígeno D, presente nas hemácias de indivíduos Rh positivo, e o que codifica os antígenos C/c e E/e, presentes nas hemácias de todos os humanos. Ambos os genes contêm dez exons e possuem seqüências altamente homólogas (Figura 1). Nas pessoas Rh negativo, o polipeptídeo *RhD* geralmente está ausente devido à deleção do seu gene específico (Bischoff *et al.*, 1999).

Figura 1. Diagrama dos genes Rh e seus dois haplótipos mais comuns, correspondendo a indivíduos *RhD* positivo e negativo.

Na prática clínica, anticorpos para os cinco antígenos (D, C, c, E, e) são utilizados para o diagnóstico sorológico (fenotípico) do grupo Rh, dependendo, em alguns casos, de técnicas de biologia molecular para sanar limitações das técnicas de hemaglutinação, como ocorre com os indivíduos portadores de antígeno *RhD* parcial ou *RhD* fraco (Barros *et al.*, 2006). Segundo Flegel e Wagner (2002), os métodos moleculares devem constituir a primeira escolha na identificação do fator Rh fetal em amostras de líquido amniótico e de células trofoblásticas obtidas das

vilosidades coriônicas, evitando procedimentos mais agressivos para o binômio materno-fetal posteriormente.

Todo indivíduo herda uma cópia dos genes correspondentes às regiões *RhD* e *RhCE* de cada um de seus progenitores. Entretanto, nas pessoas do grupo *RhD* negativo, normalmente há uma deleção completa deste gene, que poderá ser transmitida de forma hereditária. Desta forma, pode-se caracterizar uma das três seguintes situações: a presença de duas cópias do gene *RhD*, a de apenas uma cópia do mesmo ou, no último caso, de nenhuma delas. As duas primeiras situações determinam o fenótipo Rh positivo, homozigoto ou heterozigoto, respectivamente. O terceiro caso está presente em pessoas Rh negativo, ou homozigotas para a deleção do *RhD* (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do *locus* Rh no cromossomo 1. Os indivíduos *RhD* positivo podem ser homo ou heterozigotos para o gene *RhD*, enquanto os *RhD* negativo são caracterizados pela deleção deste gene.

Diferentes conjuntos de *primers* foram utilizados para a genotipagem *RhD* em diversas situações clínicas, entre as quais a identificação do fator Rh em materiais biológicos de origem embrio-fetal, como produto de biópsia de vilosidades coriônicas, líquido amniótico e sangue obtido por cordocentese, ou na pesquisa de DNA fetal livre na circulação materna.

Em 1996, Van den Veyver *et al.* descreveram quatro diferentes estratégias para tipagem por PCR: *primers* que amplificam os exons 7 e 10 dos genes *RhD* e *RhCE*, os que amplificam os exons 4 e 5, os *primers* para o exon 7 e, aqueles que amplificam os exons 4, 5 e 10. Nos últimos anos, pesquisadores desenvolveram novos métodos para a genotipagem *RhD* fetal utilizando sangue materno e observaram que, para a melhor correlação com a sorotipagem do sangue de cordão, deve-se utilizar *primers* para mais de uma região gênica (Maron; Bianchi, 2007). Em relação à técnica de genotipagem *RhD* utilizando a PCR convencional, tanto para uso em bancos de sangue quanto para a detecção do fator Rh fetal no plasma materno, o conjunto de *primers* específicos para o intron 4 e exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE* demonstrou alta acuracidade (Barros *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006).

1.2. Isoimunização Rh

A isoimunização ou aloimunização Rh é uma condição de grande importância na clínica médica e obstétrica, podendo causar a doença hemolítica do recém-nascido, reações transfusionais e anemia hemolítica auto-imune. O antígeno Rh é altamente imunogênico, sendo responsável pela maioria dos casos de isoimunização em pacientes do grupo sanguíneo Rh negativo, que correspondem a aproximadamente 15% da população caucasiana (Lo *et al.*, 1999b). Um estudo realizado na cidade de São Paulo observou a prevalência do sorotipo Rh negativo em 9,66% das puérperas e 8,86% dos recém-nascidos (Baiochi *et al.*, 2007).

Segundo Chilcott *et al.* (2002), aproximadamente 10% das gestações de pacientes caucasianas envolvem mães Rh negativo e fetos Rh positivo. Além disso, aproximadamente 60% das mães Rh negativo dão à luz filhos Rh positivo. Em

gestação de paciente Rh negativo com feto Rh positivo o risco de sensibilização ao antígeno Rh chega a 16% (Cunningham *et al.*, 2005).

Nas gestações complicadas pela aloimunização Rh, as imunoglobulinas anti-D da classe G de origem materna atravessam a barreira placentária e causam hemólise fetal com gravidade variável, mas progressiva. Nestes casos, procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos serão necessários com o intuito de reduzir a morbimortalidade perinatal dos fetos Rh positivo (Lo *et al.*, 1999b).

Segundo o Protocolo de Condutas em Gestação de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Duarte *et al.*, 2003), a tipagem sangüínea para os grupos ABO, Rh e o Coombs indireto devem ser solicitados de forma rotineira no início do seguimento pré-natal. Nos casos de resultados Rh negativo e Coombs indireto negativo considera-se a paciente não sensibilizada. Nesta situação, preconiza-se a repetição do Coombs indireto trimestralmente com o intuito de se rastrear aloimunização por provável sangramento transplacentário, que habitualmente não é suficiente para sensibilizar a grávida antes da 28ª semana (Contreras, 1998). Considera-se isoimunização Rh quando o resultado do Coombs indireto é positivo em gestante Rh negativo, sendo imprescindível a sua titulação e a identificação do anticorpo *RhD*. Um teste de Coombs indireto com títulos menores que 1/8 indica a necessidade de repetição deste exame e de ecografias com intervalos mensais, de forma a detectar possível descompensação fetal pela anemia hemolítica. Nos casos de títulos iguais ou maiores que 1/8, estão indicados procedimentos diagnósticos invasivos, ou seja, a amniocentese ou a cordocentese, com suas conhecidas complicações e risco de novos sangramentos feto-maternos que podem aumentar a gravidade da aloimunização.

No âmbito da profilaxia, é consensual na literatura que a imunoglobulina Anti-D deve ser administrada a gestantes Rh negativo em três situações: às pacientes expostas a eventos conhecidamente sensibilizantes, como abortamentos ou sangramentos uterinos volumosos; às puérperas não sensibilizadas nas primeiras 72 horas após partos de recém-nascidos Rh positivo; e, finalmente, a todas as gestantes Rh negativo após a 28ª semana gestacional (Crowther; Middleton, 2008a). Entretanto, o protocolo de uso da imunoglobulina anti-Rh tem sido motivo de controvérsia quanto ao número de aplicações no período gestacional. Há propostas para o uso na 28ª e 34ª semanas de gestação, além da dose pós-natal precoce, com o intuito de reduzir a isoimunização Rh devido aos sangramentos materno-fetais para até 0,2% (Crowther; Middleton, 2008b).

Apesar do reconhecimento do benefício que a profilaxia universal com a imunoglobulina anti-D trouxe às pacientes suscetíveis à aloimunização *RhD*, a sua administração rotineira nas gestantes Rh negativo não sensibilizadas não mais representa a conduta com as melhores relações custo e risco-benefício. O fato da imunoglobulina anti-*RhD* derivar de plasma de doadores explica as dificuldades para a sua obtenção de forma irrestrita, o seu custo elevado para os padrões brasileiros e a possibilidade, ainda que teórica, da transmissão de doenças infecto-contagiosas, fato já ocorrido com a Hepatite C na Irlanda e Alemanha no final da década de 70 (National Blood, 2003). Sabe-se que aproximadamente 40% dos binômios materno-fetais de pacientes Rh negativo têm sorotipagem *RhD* concordante, condição isenta do risco de desenvolvimento da isoimunização Rh e, portanto, sem necessidade do uso da imunoglobulina. Desta forma, preconiza-se atualmente a profilaxia pré-natal anti-D parcial ou seletiva, em detrimento da universal (Moise, 2002). Assim, a detecção precoce do *status RhD* fetal em gestações de mulheres Rh negativo,

isoimunizadas ou não, tem grande importância na definição da necessidade de intervenções invasivas, com riscos conhecidos de perda gestacional ou da imunoprofilaxia gestacional e pós-natal anti-Rh, respectivamente.

1.3. O diagnóstico pré-natal

Em tempos de globalização e rápido desenvolvimento tecnológico, torna-se impossível dissociar a clássica medicina, que remonta aos tempos de Hipócrates, da moderna ciência do século XXI, caracterizada pela profunda interação entre médico provedor e as técnicas propedêuticas avançadas. Neste cenário, importantes avanços acontecem na área da medicina fetal, onde os diagnósticos são realizados cada vez mais precocemente e de forma menos onerosa para o binômio materno-fetal. As técnicas para diagnóstico fetal evoluem rapidamente, buscando-se sempre o desenvolvimento e aprimoramento desses procedimentos (Levi *et al.*, 2003).

No intuito de reduzir os reconhecidos riscos de técnicas como a amniocentese e a cordocentese, os avanços na área de biologia molecular possibilitam diagnósticos pré-natais acurados e menos invasivos para os fetos (Gerovassili *et al.*, 2007). Desta forma, cabe ao obstetra manter-se atualizado sobre os avanços nesta área promissora, objetivando a aplicação destes recursos na sua prática clínica e a melhora dos resultados perinatais.

A determinação do fator Rh fetal no início da gestação é condição fundamental na condução de gestações de paciente Rh negativo. Dentre os materiais biológicos de interesse obstétrico submetidos à PCR para genotipagem *RHD*, citam-se a amostra de biópsia de vilosidades coriônicas (BVC), o líquido amniótico, o sangue obtido de cordocentese, o lavado de muco endocervical e os

tecidos provenientes de abortamento e de prenhez ectópica. Recentemente, com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis de biologia molecular, tornou-se possível o diagnóstico pré-implantacional e, finalmente, a amplificação de DNA livre de células de origem fetal provenientes do sangue e derivados de gestantes Rh negativo (Denomme; Fernandes, 2007).

1.4. DNA fetal proveniente das células fetais na circulação materna

Em 2004, Bianchi afirmou que as complicações gestacionais decorrentes do uso da amniocentese ou da cordocentese poderiam ser evitadas e substituídas pela pesquisa de células fetais intactas e do DNA fetal livre presentes na corrente sangüínea materna. Nesse contexto, técnicas não invasivas de amostragem de células fetais têm sido intensamente pesquisadas desde a sua primeira demonstração até as últimas décadas (Walknowska *et al.*, 1969; Lo, 2005).

Embora a detecção de células fetais em parênquima pulmonar de mulheres com eclâmpsia tenha ocorrido, pela primeira vez, no século XIX (Schmorl, 1893), a presença das mesmas em sangue periférico materno ainda é objeto de pesquisas. Assim, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de comprovar a passagem de células trofoblásticas, eritrócitos e leucócitos fetais para a circulação materna (Mueller *et al.*, 1990; Bischoff *et al.*, 2005; Alberry *et al.*, 2007).

Em 1989, Lo *et al.* demonstraram a análise de células fetais presentes na circulação materna utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Sabe-se que as células fetais estão presentes na circulação materna desde o primeiro trimestre até o final da gestação. O diagnóstico pré-natal precoce de aneuploidias e doenças genéticas é feito pela análise de células fetais isoladas do sangue materno

(Thomas *et al.*, 1995). Entretanto, o isolamento de células fetais da circulação materna é tecnicamente complexo, fato que justifica a sua utilização pouco freqüente (Bianchi, 1998).

Segundo Bianchi *et al.* (1996), a presença de células fetais nucleadas na circulação materna é rara. Atualmente, o diagnóstico pré-natal não invasivo pelo isolamento e pela análise genética destas células evidencia sua persistência na circulação materna por longo período, uma vez que são detectadas em mulheres com gestações anteriores. O DNA nuclear amplificado por PCR para seqüências de cromossomo Y em mulheres longo tempo após uma gravidez do sexo masculino foi considerado como uma evidência de células fetais masculinas persistentes. Há relatos de DNA nuclear de feto masculino ter sido detectado em mulher que teve seu último filho 27 anos antes do estudo.

1.5. DNA fetal livre na circulação materna

Em 1996, Chen *et al.* demonstraram a existência de DNA tumoral livre (do interior das células neoplásicas) no plasma de pacientes em seguimento oncológico. Este achado levantou a suspeita que o mesmo poderia ocorrer em situações biológicas onde DNA heterólogo pudesse ser encontrado na circulação. Na gestação, a lógica do seu uso baseia-se na detecção e amplificação de seqüências genéticas fetais herdadas do genoma paterno e que estão ausentes no materno, utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, Lo *et al.* (1997) demonstraram de forma pioneira a presença do DNA fetal livre (DNA-fl) de células no plasma de mulheres grávidas. Segundo estes pesquisadores, a concentração relativa média de DNA-fl no plasma materno varia de 3,4 a 6,2% com o decorrer da

gestação, podendo alcançar concentrações próximas a 12% do DNA total presente na amostra estudada, ao passo que as células fetais podem estar presentes no sangue materno numa proporção igual ou inferior a 1:100.000 células maternas (Lo *et al.*, 1998a).

Sabe-se que a concentração média de DNA fetal no plasma, cuja paucidade de ácidos nucleicos é conhecida, é de 150 pg/ml na 16ª semana gestacional (Daniels *et al.*, 2005) e de aproximadamente 522 pg/ml na 30ª semana (Rijnders *et al.*, 2004). Estes dados reforçam a necessidade da utilização de PCR convencional com grande sensibilidade ou a utilização de PCR em tempo real. A partir destes resultados, estudos evidenciaram a superioridade prática do DNA fetal plasmático em relação às preparações de células fetais isoladas do sangue materno (Ramos, 2006; Sekizawa *et al.*, 2007). Além disso, o isolamento do DNA fetal a partir do plasma materno é relativamente fácil, de baixo custo e permite o processamento simultâneo de várias amostras (Blazer *et al.*, 2004).

Outra grande vantagem da utilização do DNA-fl em comparação com as células fetais é a completa depuração do DNA fetal livre após duas a três horas da dequitação, impossibilitando o achado de resultados falsos positivos devido à detecção de material genético oriundo de gestações prévias. Segundo Kolialexi *et al.* (2004), entre 37 e 38 semanas a taxa de apoptose é de 12,5% (9,2-14,7%). Trinta minutos após o parto atinge o valor máximo de 25,1% (16,8-28,5%), em 12 horas 12,5% (10,9-14,1%), em 24 horas 6,1% (4,8-7,1%), e em 48 horas 2,3% (1,3-3,0%). Portanto, após o parto as células fetais no plasma materno sofrem apoptose em até 48 horas e essa apoptose explicaria, em parte, o desaparecimento do DNA fetal da circulação materna logo após o nascimento, visto que é uma reação rápida.

As seqüências do cromossomo Y em grávidas são os marcadores de DNA fetal mais utilizados na literatura, pois podem ser demonstrados em cinquenta por cento da população, ou seja, nos fetos do sexo masculino (Liu *et al.*, 2007). Entretanto, a ausência de amplificação de DNA Y específico impossibilita a utilização desta metodologia nos fetos do sexo feminino, o que levou à necessidade de se encontrar novos alvos, dentre eles o genótipo *RhD*, primeiramente descrito por Lo *et al.* em 1998, cuja análise constitui o motivo desta dissertação. Além destes, pesquisas recentes envolvem a detecção de fetos portadores da síndrome de Down (Lo *et al.*, 1999a), da acondroplasia (Saito *et al.*, 2000) e da α -talassemia (Chiu *et al.*, 2002).

Atualmente, avanços tecnológicos propiciam a utilização de equipamentos de detecção em tempo real (*real-time* PCR), possibilitando com isso menor risco de contaminação e a obtenção de elevadas taxas de sensibilidade, pois descartam a manipulação após a amplificação das seqüências gênicas desejadas (Bischoff *et al.*, 2002, Bianchi, 2004; Boon *et al.*, 2007). Finning *et al.* (2008), demonstraram a efetividade de uma técnica robótica automatizada para processamento das etapas de extração e realização do PCR em tempo real. Contudo, a disponibilidade de tais métodos ainda está restrita a poucos laboratórios no âmbito dos países não industrializados, o que justifica a contínua pesquisa visando a obtenção de resultados confiáveis a partir da utilização de técnicas mais acessíveis, como o PCR convencional.

2 - JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto possui um ambulatório especializado para o atendimento pré-natal das gestantes isoimunizadas referenciadas deste e dos outros municípios pertencentes à Direção Regional XVIII (DIR XVIII), sendo coordenado pelo Grupo de Gestação de Alto Risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO-FMRP-USP). O serviço permite a obtenção de uma amostra privilegiada, que tem sido estudada com o objetivo de melhorar o atendimento aos pacientes e seus familiares, bem como a realização de pesquisa básica.

A PCR é descrita como um método acurado de genotipagem *RhD*, pois identifica a presença de regiões específicas dos genes *RhCE* e *RhD* que, pelo método de hemaglutinação, podem ter sua expressão antigênica parcial ou atenuada, não atendendo às necessidades assistenciais que a situação exige.

Do ponto de vista prático, o diagnóstico biomolecular do fator Rh representa importante avanço em casos de perdas gestacionais precoces como abortamento e prenhez ectópica, fundamental para a decisão sobre quais gestantes realmente necessitarão de profilaxia anti-D. Com este objetivo e o respaldo da literatura atual, neste estudo propõe-se a análise do fator *RhD* utilizando sangue de indivíduos Rh positivo e negativo com o intuito de estabelecer a acuracidade desta técnica e testar a sua sensibilidade, de forma a determinar em quais tecidos a PCR convencional poderá ser posteriormente avaliada. Com isso, abre-se precedente para outros projetos na linha de pesquisa de diagnóstico pré-natal no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3 - HIPÓTESES

H0: A técnica de detecção do fator Rh em adultos utilizando a PCR convencional não apresenta a sensibilidade necessária para esta finalidade.

H1: A técnica de detecção do fator Rh em adultos utilizando a PCR convencional apresenta a sensibilidade necessária para esta finalidade.

4 - OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral:

Utilizar a PCR convencional para o diagnóstico do fator Rh.

4.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar o desempenho da PCR convencional na genotipagem do fator Rh;
2. Verificar as associações existentes entre os achados moleculares com a sorotipagem *RhD*, para verificar a sensibilidade e a especificidade do método.

5 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. Critérios de inclusão

Foram incluídas amostras de sangue de indivíduos hígidos, ou seja, mulheres e homens sem doenças conhecidas, dos grupos sangüíneos Rh positivo e negativo.

5.2. Critérios de exclusão

Não aceitar participar do estudo ou não ter condições de compreender e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3. Amostragem

O presente estudo é constituído por um grupo de indivíduos arrolados de forma transversal, cujas coletas únicas de amostras de sangue ocorreram após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, sem aleatorização prévia. O diagnóstico do grupo sangüíneo Rh, necessário para comparação com os resultados dos testes realizados, foi obtido realizando a sorotipagem das amostras com os anticorpos do grupo Rh.

Para cumprir estes objetivos foram utilizadas amostras de sangue de vinte e três indivíduos, que compreenderam dezenove mulheres e quatro homens hígidos, dos grupos sangüíneos Rh positivo (11) e negativo (12).

5.4. Local de realização

O projeto foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da FMRP-USP, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos dessa instituição, Processo HCRP nº 15501/2005 (Anexo 1). O consentimento por escrito dos

integrantes foi solicitado após a apresentação e leitura do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Apêndice A). Foi explicado aos participantes que se tratava de técnica em fase experimental. O questionário referente ao Apêndice B foi obtido por entrevista após o consentimento do paciente. Os resultados, apenas de interesse da pesquisa, foram comunicados àqueles que manifestaram desejo.

A coleta de sangue foi realizada nas dependências do HCFMRP-USP, enquanto a análise molecular foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Genética da Reprodução, situado no Departamento de Genética da FMRP-USP.

5.5. Métodos

5.5.1. Coleta da amostra e extração de DNA

Foram coletados, após assinatura do termo de consentimento, 5 ml de sangue periférico por venopunção em tubos Vacutainer K3 EDTA da fabricante *Beckton-Dickinson*.

O DNA foi extraído das amostras de sangue por dois protocolos distintos, sem diferenças, no entanto, na obtenção de produtos de DNA armazenados em alíquotas com a concentração de 100 ng/μl. O primeiro método utilizado foi o da extração e precipitação em NaCl (Olerup; Zetterquist, 1992). O segundo, descrito em publicações recentes, empregou o *QIAamp® Blood Mini Kit* da Qiagen (Chattlesworth, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante, apresentados de forma resumida:

Acrescentou-se 20 µl de enzima protease e 200 µl de *buffer* AL a 200 µL da amostra de sangue total, seguido de mistura no pulso-vortex por 15 segundos e incubação a 56°C por 10 minutos. A seguir, adicionaram-se 200 µl de etanol absoluto, misturando-se no pulso-vortex por 15 segundos. Esta mistura foi aplicada na coluna montada do *kit*, cetrifugando-a por 1 minuto a 8.000 rpm. Desprezou-se o filtrado e, em novo tubo, adicionou-se 500 µl de *buffer* AW1. Na seqüência, este material foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm, descartando-se o filtrado com a troca do tubo. Adicionou-se 500 µl do *buffer* AW2, centrifugando a mistura por mais 3 minutos a 14.000 rpm. Adicionou-se mais 200 µl de *buffer* AE, incubando à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esta etapa, centrifugou-se todo o material por 1 minuto a 8.000 rpm, armazenando-se o produto da extração em tubo de 1,5 µl.

5.5.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a obtenção dos resultados desta pesquisa foi realizada a PCR convencional utilizando sangue como substrato de DNA. A PCR foi realizada em aparelho termociclador da marca Stratagene® - Robo Cyclor 40, seguindo os protocolos da referida empresa e de Innis *et al.* (1990). Os *primers* selecionados para amplificação de seqüências dos genes do grupo Rh visaram identificar as diferenças entre os genes *RhD* e *RhCE* em duas diferentes regiões genômicas, localizadas no intron 4 e no exon 10.

Para a amplificação do intron 4 foi utilizado um conjunto de três *primers*, denominados RHI41, RHI42 e RHI43. A leitura do resultado da sua PCR demonstra dois produtos distintos, um para o gene *RhD* com 115 pares de base (pb) e outro para o gene *RhCE*, com 557 pb. Já para a reação de amplificação do exon 10, três

primers foram usados: um *primer* 5' comum, denominado EX10F, que pareado com o *RHD*3'-UTR gera um produto de 245 pb específico para o *RhD* e, que quando pareado com o *primer* *RHCE*3'-UTR, amplifica um produto de 160 pb, específico para o *RhCE*. As seqüências utilizadas estão caracterizadas na tabela 1.

Tabela 1. *Primers* para as seqüências do intron 4 e exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*.

Primers	Seqüência
RHI41	5'-GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC-3'
RHI42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC-3'
RHI43	5'-ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG-3'
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA-3'
<i>RHD</i> 3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG-3'
<i>RHCE</i> 3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC-3'

O protocolo de ciclagem foi definido após a padronização das condições de estringência e realizado no sangue dos indivíduos arrolados. Cada amostra de DNA foi amplificada em duplicata com o objetivo de evitar resultados falsos negativos por falha técnica. Desta forma, cada amostra foi submetida a duas PCRs.

A PCR foi realizada em tubos de 200 µL, com volume total de 25 µL. Os constituintes do *mix* utilizado na reação para o exon 10 foram: 18,8 µL de água milliQ, 2,5 µL de solução tampão (constituída de 20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol e estabilizadores), 1,0 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP (bases púricas e pirimídicas diluídas em água ultra pura), 0,3 µL dos *primers* EX10F, *RHCE*3'-UTR, 0,4 µL do *primer* *RHD*3'-UTR (Tabela 1), 0,2 µL de *Taq* Polimerase e 1 µL do DNA extraído, na concentração de 100 ng de DNA/µL. Para a reação do

intron 4, o *mix* foi composto por 19,05 µL de água milliQ, 2,5 µL da solução tampão supracitada, 0,75 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 0,3 µL dos *primers* RHI41, RHI42, 0,4 µL do *primer* RHI43 (Tabela 1), 0,2 µL de *Taq* Polimerase e 1 µL do DNA extraído na mesma concentração de 100 ng/µL.

Para controlar a qualidade das reações, em cada uma delas foi incluído um *mix* contendo água, que serviu como controle interno negativo de contaminação. A amplificação de duas regiões gênicas diferentes por conjunto de *primers* (*RhD* e *RhCE*) funcionou como controle interno de amplificação de DNA para cada amostra, pois a presença da banda correspondente ao *RhCE* confirmaria a presença do ácido nucleico. Adicionalmente, em cada reação foram usadas amostras de pacientes sabidamente *RhD* positivo e negativo para fins de comparação.

O protocolo de ciclagem utilizado na PCR para o exon 10 consistiu em cinco minutos de denaturação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos por: denaturação a 94°C por 35 segundos (s), pareamento a 59,5°C por 35 s e extensão a 72°C por 35 s. Uma fase de extensão final a 72°C por 10 minutos foi incluída no fim do último ciclo, seguida da fase de inativação da reação a 10°C por cinco minutos. Para a reação do intron 4, na etapa correspondente aos 35 ciclos foi necessário reduzir os tempos da denaturação, pareamento e extensão para 30 segundos, além da redução da temperatura de pareamento para 59°C. Não houve alteração das demais etapas.

A leitura das reações foi feita em gel de poliacrilamida corado por prata, obtida após aplicação dos produtos de DNA e eletroforese em tampão de Tris-Borato-EDTA a 1%. Os resultados foram devidamente digitalizados e armazenados em computador para posterior comparação com os resultados das tipagens sangüíneas pela hemaglutinação das amostras de sangue investigadas. No

momento do exame, o responsável pela análise da PCR desconhecia os grupos sanguíneos obtidos pela sorotipagem via hemaglutinação.

A interpretação dos resultados se baseou na análise conjunta das bandas amplificadas para os genes *RhD* e *RhCE* nas regiões dos intron 4 e exon 10. Foram consideradas *RhD* negativo as amostras que não apresentavam as duas bandas referentes ao gene *RhD* (115 pb para o intron 4 e 245 pb para o exon 10), porém amplificaram pelo menos uma das bandas esperadas para o gene *RhCE* (557 pb e 160 pb para o intron 4 e exon 10, respectivamente). Para a definição do genótipo *RhD* positivo foi necessário identificar pelo menos uma das bandas relativas ao gene *RhD* (115 pb e 245 pb para o intron 4 e exon 10, respectivamente).

5.5.3. Análise estatística

A análise estatística comparou os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase das amostras de sangue e a sorotipagem obtida pela hemaglutinação das mesmas. Para tanto, optou-se pela utilização da matriz de confusão que, segundo Monard e Baranauskas (2003), é um instrumento efetivo para avaliação de classificações corretas comparadas às classificações preditas para uma classe, em um determinado conjunto de exemplos. Em uma matriz de confusão de duas classes, que foi a utilizada neste estudo, definiu-se como classe observada o método padrão para o diagnóstico do grupo sanguíneo Rh, ou seja, a hemaglutinação. Já a classe predita abrangeu o teste diagnóstico em investigação, ou seja, a PCR para genotipagem *RhD* no sangue.

A tabela da matriz de confusão utilizada para a análise estatística está representada na tabela 2.

Tabela 2. Tabela da matriz de confusão utilizada para a realização da análise estatística.

Classe Observada (Hemaglutinação)	Classe Predita (PCR: <i>RhD</i>)		Total
	Positivo	Negativo	
<i>RhD</i> Positivo			
<i>RhD</i> Negativo			
Total			
Medida	Sigla	Fórmula	Resultado
Verdadeiro Positivo	TP		
Verdadeiro Negativo	TN		
Falso Positivo	FP		
Falso Negativo	FN		
Total Preditos Positivos	L		
Total Preditos Negativos	lt(trazo)		
Total Observados Positivos	r		
Total Observados Negativos	rt(trazo)		
Total	n		
Valor Preditivo Positivo	VPP	$TP/(TP+FP)$	
Valor Preditivo Negativo	VPN	$TN/(TN+FN)$	
Sensibilidade	Sens	$TP/(TP+FN)$	
Especificidade	Spec	$TN/(TN+FP)$	
Precisão Total	Tacc	$(TP+TN)/n$	

Seguem as descrições dos termos constantes da matriz de confusão:

- 1- Verdadeiro Positivo (*TP*): número de exemplos positivos classificados corretamente;
- 2- Verdadeiro Negativo (*TN*): número de exemplos negativos classificados corretamente;
- 3- Falso Positivo (*FP*): número de exemplos positivos classificados erroneamente pela classe predita;

- 4- Falso Negativo (FN): número de exemplos negativos classificados erroneamente pela classe predita;
- 5- Total Preditos Positivos (I): total de exemplos classificados como positivos pela classe predita;
- 6- Total Preditos Negativos ($\bar{I}$): total de exemplos classificados como negativos pela classe predita;
- 7- Total Observados Positivos (r): total de exemplos classificados como positivos pela classe observada;
- 8- Total Observados Negativos ($\bar{r}$): total de exemplos classificados como negativos pela classe observada;
- 9- Total (n): número total.

Várias análises podem ser derivadas a partir da matriz de confusão (Weiss; Kulikowski, 1991; Piatetsky-Shapiro; Frawley, 1991), possibilitando a descrição do comportamento da classe predita em relação à classe observada:

- 1- Valor Preditivo Positivo [$TP/(TP+FP)$]: relaciona a capacidade do método diagnóstico classificar como verdadeiros positivos em relação ao total de preditos positivos. Uma alta confiabilidade positiva indica que o resultado *RhD* positivo *pela PCR* do sangue resultará em alta probabilidade do indivíduo ser *RhD* positivo pela hemaglutinação;
- 2- Valor Preditivo Negativo [$TN/(TN+FN)$]: relaciona a capacidade do método diagnóstico classificar como verdadeiros negativos em relação ao total de preditos negativos. Uma alta confiabilidade negativa indica que o resultado *RhD* negativo *pela PCR* do sangue resultará em alta probabilidade do paciente ser *RhD* negativo pela hemaglutinação;

- 3- Sensibilidade $[TP/(TP+FN)]$: mensura a porcentagem de verdadeiros positivos em relação à classe observada positiva. O método diagnóstico será considerado sensível quando o indivíduo *RhD* positivo pela PCR do sangue estiver relacionado ao *RhD* positivo pela hemaglutinação;
- 1- Especificidade $[TN/(TN+FP)]$: mensura a porcentagem de verdadeiros negativos em relação à classe observada negativa. O método diagnóstico será considerado específico quando o paciente *RhD* negativo pela PCR do sangue estiver relacionado ao *RhD* negativo pela hemaglutinação;
- 2- Precisão Total $[(TP+TN)/n]$: mensura a porcentagem de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. O método diagnóstico será considerado preciso quando classificar corretamente o genótipo *RhD*.

6 - RESULTADOS

No presente estudo foi desenvolvida uma técnica de biologia molecular capaz de identificar satisfatoriamente o genótipo Rh de sangue periférico em adultos. Desta forma, duas reações em cadeia da polimerase foram padronizadas em amostras de sangue de vinte e três indivíduos Rh positivo e negativo confirmados pela hemaglutinação. Cada uma destas reações utilizou um conjunto diferente de *primers*, específicos para o intron 4 ou o exon 10, visando a amplificação de duas regiões gênicas altamente homólogas do gene Rh, a *RhD*, presente apenas nos indivíduos Rh positivo, e a *RhCE*, amplificada em todos os seres humanos.

Durante a fase de padronização, observou-se um melhor desempenho da PCR ao se utilizar amostras de DNA conservado a -20°C por pelo menos 24 horas após a finalização da técnica de extração, quando comparado com o uso deste DNA logo após a finalização da técnica de extração.

Na etapa inicial, o protocolo de ciclagem foi definido para cada conjunto de *primers* após padronização das condições de estringência da PCR no sangue de dois pacientes Rh positivo e dois Rh negativo. Após a definição das melhores condições para a realização de cada reação, as mesmas foram executadas nas amostras dos vinte e três pacientes arrolados.

Para a interpretação dos resultados da PCR utilizando os *primers* para o exon 10, são consideradas Rh positivo as amostras onde se identificam as bandas correspondentes aos genes *RhD* e *RhCE*, com 245 pb e 160 pb, respectivamente (figura 3). As amostras Rh negativo amplificam apenas fragmentos de comprimento 160 pb, correspondentes ao gene *RhCE*. De forma semelhante, em relação à PCR que utilizou *primers* para o intron 4, são consideradas Rh positivo as reações que amplificam os fragmentos de comprimento 115 pb (*RhD*) e 557 pb (*RhCE*). Nos casos Rh negativo, a primeira banda não está presente (figura 4).

Figura 3. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb demonstrando as bandas correspondentes a 100, 200 e 300 pb; colunas (1) e (3) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; colunas (2) e (4) DNA extraído de sangue de pacientes Rh negativo.

Figura 4. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR para a região do intron 4 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb; colunas (1), (2), (3) e (5) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; coluna (4) DNA extraído de sangue de paciente Rh negativo.

Na tabela 3 estão expostos os resultados das PCRs para o exon 10 e para o intron 4, os resultados da hemaglutinação e os possíveis resultados falso positivo e negativo para cada amostra testada. Como pode ser observado, houve total correlação entre os resultados positivos de ambas as reações de PCR para a genotipagem *RhD* e a hemaglutinação das amostras de sangue consideradas positivas, sem nenhum resultado falso positivo ou negativo.

Tabela 3. Resultados da amplificação de seqüências do intron 4 e exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE* comparados com o resultado da sorotipagem do sangue do grupo de estudo.

Caso	<i>RhD</i> exon 10	<i>RhD</i> intron 4	Sorotipagem <i>RhD</i>
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	-	-	-
13	+	+	+
14	+	+	+
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	+	+	+
23	-	-	-

(-) Negativo; (+) Positivo.

Com a finalidade de verificar a sensibilidade do método de biologia molecular para genotipagem *RhD*, diferentes concentrações de DNA Rh positivo e negativo (diagnosticados pela hemaglutinação) foram diluídas em água. O volume final destas diluições totalizou 1 µl de *template*, que foram incluídos no *mix* das PCRs. As diluições do DNA Rh positivo e do Rh negativo estão expostas na tabela 4. Foram

obtidos resultados concordantes com os da hemaglutinação por ambas as PCRs em todas as diluições de DNA preparadas. A figura 5 ilustra os resultados das diluições realizadas para a reação do exon 10.

Tabela 4. Diluições do DNA Rh positivo e as concentrações utilizadas para determinar a sensibilidade na PCR.

Diluição	Concentração inicial do DNA	Concentração do DNA no <i>mix</i> da PCR (25 μ l)
1	100 ng/ μ l	4 ng/ μ l
2	50 ng/ μ l	2 ng/ μ l
3	25 ng/ μ l	1 ng/ μ l
4	10 ng/ μ l	400 pg/ μ l
5	5 ng/ μ l	200 pg/ μ l
6	1 ng/ μ l	40 pg/ μ l
7	100 pg/ μ l	4 pg/ μ l

Figura 5. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR de amostras de DNA diluídas em água para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb; as colunas (100), (50), (25), (10), (5) e (1) demonstram as concentrações em ng/ μ l das diluições do DNA extraído de sangue em água; a coluna (100 pg) demonstra a concentração de 100 pg/ μ l obtida pela diluição do DNA extraído de sangue em água; (+) DNA extraído de sangue de pacientes Rh positivo; (-) DNA extraído de sangue de pacientes Rh negativo; (B) Controle interno branco, sem DNA.

De forma complementar, outra avaliação foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de detecção em materiais nos quais há baixa proporção relativa do DNA fetal, situações semelhantes àsquelas encontradas para a genotipagem *RhD* fetal no sangue, plasma ou soro maternos. Para tal, foram preparadas diluições progressivas de DNA extraído de paciente Rh positivo no produto de extração de ácido nucléico de indivíduo sabidamente Rh negativo, totalizando 1 µl de *templates* utilizados para PCR. As diluições descritas estão demonstradas na tabela 5. De forma semelhante, ambas as reações para o intron 4 e para o exon 10 foram bem sucedidas em amplificar não só a banda correspondente ao gene *RhCE*, mas também a do gene *RhD* em todas as diluições (vide figura 6).

Tabela 5. Diluições progressivas do DNA Rh positivo em DNA Rh negativo e as concentrações disponíveis de DNA para a PCR.

Número da diluição	Proporção do DNA <i>RhD</i> + / DNA <i>RhD</i> -	Concentração inicial do DNA <i>RhD</i> +	Concentração do DNA <i>RhD</i> + no <i>mix</i> da PCR (25 µl)
1	100%	100 ng/µl	4 ng/µl
2	0%	0 ng/µl	0 ng/µl
3	50%	50 ng/µl	2 ng/µl
4	25%	25 ng/µl	1 ng/µl
5	10%	10 ng/µl	400 pg/µl
6	5%	5 ng/µl	200 pg/µl
7	1%	1 ng/µl	40 pg/µl

Figura 6. Imagem digitalizada da eletroforese em gel de poliacrilamida corado por prata dos produtos da PCR de amostras de DNA positivo diluídas em DNA negativo para a região do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE*. (M) Marcador de 100 pb demonstrando as bandas correspondentes a 100 e 200 pb; colunas (100%), (0%), (50%), (25%), (10%), (5%) e (1%) Diluições do DNA extraído de sangue Rh positivo em DNA extraído de sangue Rh negativo.

A análise estatística dos casos estudados demonstrou que a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e a precisão foram de 100% para ambas as PCRs nas amostras colhidas de indivíduos Rh positivo e negativo (vide tabela 6). Não houve nenhum caso de resultado falso positivo ou falso negativo. No apêndice C encontra-se exposta a tabela que contém a matriz de confusão com os dados estatísticos deste estudo.

Tabela 6. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da PCR para genotipagem *RhD*.

Fator Rh	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
Positivo	100 %	100 %	100 %	100 %
Negativo	-	-	-	-

(-) por se tratar de um teste onde se pesquisa a presença do gene *RhD*, este não é um exame para detecção do fator Rh negativo, que é deduzido pela sua ausência.

7 - DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a PCR convencional é uma ferramenta que pode ser utilizada para amplificação de DNA contido em materiais biológicos de forma confiável, com o intuito de genotipagem do grupo sanguíneo Rh, concordando com os dados disponíveis na literatura (Van der Schoot *et al.*, 2003).

A PCR trouxe grande auxílio na detecção do fator Rh, pois é um método de custo relativamente baixo, que está disponível em vários centros de atenção terciária, rápido, de boa reprodutibilidade e capaz de detectar DNA presente em mínimas concentrações. Além disso, propicia a identificação do genótipo Rh, ao invés de detectar a sua expressão fenotípica nos antígenos presentes nas paredes das hemácias, que podem apresentar variável imunorreatividade e dificultar a interpretação do potencial para a sensibilização Rh (Van den Veyver; Moise, 1996).

A presente pesquisa estudou um método de biologia molecular capaz de identificar com 100% de sensibilidade e especificidade o genótipo *RhD* em sangue de homens e mulheres Rh positivo e negativo pela hemaglutinação. Por si só, este resultado tem importante implicação clínica, pois possibilita a correta genotipagem *RhD* do casal com o objetivo de determinar se há risco de gerarem feto Rh positivo. Ademais, permite fornecer o resultado em sangue de cordão umbilical com intervalo de apenas um dia e indicar se há necessidade do uso da imunoglobulina anti-D profilática, que deve ser realizada nas primeiras 72 horas do puerpério, caso haja incompatibilidade Rh entre mãe não sensibilizada e seu recém-nato.

Na condução de gestações de paciente Rh negativo, há grande interesse em se determinar o fator Rh fetal no início da gestação. Vários estudos foram publicados utilizando a PCR para a amplificação de DNA em materiais de interesse obstétrico, como na amostra de biópsia de vilosidades coriônicas, no líquido amniótico, em sangue obtido de cordocentese, no lavado de muco endocervical, em tecidos

provenientes de abortamento, prenhez ectópica, diagnóstico pré-implantacional e, finalmente, no sangue e derivados provenientes de pacientes Rh negativo, com o intuito de ampliação de DNA livre de células de origem fetal (Denomme; Fernandes, 2007).

A análise do sangue proveniente de punção funicular intra-uterina para determinação do fator Rh fetal é uma aplicação imediata da técnica de PCR avaliada por esta pesquisa, porém tem sido cada vez mais relegada a um segundo plano, pois apresenta um risco de óbito fetal em 3% das tentativas, além de ser causa de hemorragias transplacentárias que cursam com aumento dos títulos do Coombs indireto em aproximadamente 30% dos procedimentos (Weiner; Okamura, 1996; Weiner, 1990). Entretanto, caso haja outras indicações para a realização da cordocentese, inclusive a necessidade de avaliação do hematócrito e transfusão em fetos de mães aloimunizadas, a genotipagem *RhD* poderá ser obtida com rapidez e precisão.

Segundo dados da literatura, Bennett *et al.* (1993) foram os primeiros a descrever um par de *primers* utilizados na identificação dos exons 7 e 10 dos genes *RhD* e *RhCE* provenientes de quinze gestações submetidas a BVC. Com a obtenção de 100% de acerto definiram que esta técnica evitaria a cordocentese em duas de cada cinco gestantes, ou seja, aquelas portadoras de fetos Rh negativo. As amostras obtidas pela BVC fornecem material rico em DNA e com menor taxa de perdas gestacionais do que a cordocentese. Esse material é passível de análise pela utilização da técnica de PCR desenvolvida nesta pesquisa, porém, este procedimento realizado precocemente não obteve ampla aceitação devido ao risco de deformidades de membros (Cavallotti *et al.*, 2004).

Entre os materiais de origem fetal utilizados para determinação da genotipagem *RhD*, o que obteve maior reprodutibilidade e aceitação foi o líquido amniótico obtido por amniocentese. Fauza (2004) relata que se este procedimento for realizado evitando a punção placentária, o risco de perda gestacional é de aproximadamente 0,3%, enquanto a taxa de aumento dos títulos do Coombs indireto por hemorragia feto-materna é menor que 3%. Assim, a punção amniótica visando a PCR para determinação do Rh fetal pode ser realizada a partir da 18ª semana de gestações com risco para anemia fetal e pais heterozigotos ou desconhecidos para o gene *RhD*, e mesmo durante a coleta de líquido amniótico em gestantes sensibilizadas, para avaliação dos gráficos de densidade ótica (ΔOD_{450}) descritos por Liley em 1961.

Em relato da experiência de um serviço português na análise do genótipo *RhD* fetal no líquido amniótico de 2030 gestantes Rh negativo, Pereira *et al.* (2007) desenvolveram uma PCR multiplex para os introns 3 e 4, exon 7 e 3'UTR do gene *RhD* e compararam seus resultados com a hemaglutinação do sangue de cordão umbilical, obtendo 99,5% de concordância.

Os estudos supracitados ilustram a aplicabilidade ampla e atual do diagnóstico invasivo na condução pré-natal de pacientes em risco para isoimunização Rh. Os tipos de amostras citadas, entre elas o sangue do cordão umbilical, as vilosidades coriônicas, os restos ovulares e o líquido amniótico são caracterizados pela elevada concentração de DNA fetal ou embrionário. Assim, com o intuito de avaliar a sensibilidade da PCR para seqüências do intron 4 e do exon 10 dos genes *RhD* e *RhCE* realizamos diluições progressivas de DNA sabidamente Rh positivo em água. Esta reação comprovou que concentrações tão pequenas quanto 4 pg/ μ l (ou 4.000 pg/ml) de DNA no *mix* podem ser detectados nas amostras

estudadas, o que leva à conclusão que a técnica estudada tem sensibilidade adequada para a genotipagem *RhD* nas amostras coletadas pelos métodos relatados. Para fim de comparação, a concentração média de DNA fetal no plasma, cuja paucidade de ácidos nucleicos é conhecida, é de 150 pg/ml com 16 semanas (Daniels *et al.*, 2005) e de aproximadamente 522 pg/ml na 30ª semana gestacional (Rijnders *et al.*, 2004), enquanto a concentração de DNA fetal livre no líquido amniótico foi descrita como sendo pelo menos 200 vezes maior que a do plasma (Bianchi, 2004), atingindo níveis detectáveis pela PCR estudada.

Não há dúvidas de que o avanço de maior repercussão na genotipagem *RhD* em obstetrícia seria a capacidade de detectar DNA extraído de material biológico materno, pioneiramente descrito por Lo *et al.* desde 1997. Segundo este autor, as concentrações médias de DNA fetal livre em relação ao materno variam entre 3,4 a 6,2% no plasma, aumentando com a idade gestacional e podendo chegar a 11,4% do DNA total. No soro, as concentrações médias variam entre 0,13 e 1,0%, podendo atingir 3,97% do DNA total no final da gestação. Sendo assim, o plasma parece ser mais adequado para a pesquisa do DNA fetal livre.

Diversos estudos mostram a efetividade da detecção do genótipo *RhD* utilizando a PCR em tempo real, tanto no plasma como no soro e no sangue total. Estudo de meta-análise avaliou 44 protocolos publicados em língua inglesa sobre o assunto e concluiu que a acurácia diagnóstica da detecção de DNA fetal livre no sangue total foi 91,8%, no plasma 96,5% e no soro materno 96,1%, após exclusão de publicações com menos de 10 casos e daquelas com pacientes avaliados em mais de uma ocasião. Outro resultado do estudo foi a estratificação da acurácia por idade gestacional da época da coleta, que foi 90,8% no primeiro trimestre, 85% no segundo e 85,3% no trimestre final (Geifman-Holtzman *et al.*, 2006). Entretanto, a

disponibilidade da PCR em tempo real e os custos envolvidos na obtenção dos seus *primers*, reagentes e na sua manutenção inviabilizam a difusão deste método para centros com menor poder financeiro. Poucos estudos utilizaram a PCR convencional para a genotipagem *RhD* fetal, com resultados muito variáveis (Faas *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003; Siva *et al.*, 2003), porém a pesquisa de Machado *et al.* (2006) obteve acurácia geral de 97,3%, sensibilidade de 98,3% e especificidade de 93,8%, com 7,4% de falha de amplificação. Publicações como estas motivaram a realização de novos estudos com a PCR convencional.

No intuito de simular o diagnóstico não invasivo do fator Rh fetal no sangue materno, realizaram-se diluições progressivas de sangue Rh positivo em Rh negativo com proporções conhecidas. Foi possível identificar a banda correspondente ao gene *RhD* em diluições de até 1% de sangue Rh positivo na amostra Rh negativo, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 40 pg/ μ l (ou 40.000 pg/ml) de DNA no *mix*. A banda correspondente ao gene *RhCE* foi amplificada em todas as diluições, como era esperado, sem interferir com a avaliação do gene *RhD*. Este resultado mostra que as reações analisadas têm alta sensibilidade, amplificando baixas concentrações de DNA. Porém, a transposição deste método, que utiliza o sangue, para a realização no plasma de pacientes Rh negativo exige nova padronização e uma maior atenção às características específicas deste meio, como a conhecida baixa concentração de DNA total e a presença de substâncias inibidoras de PCR, como os lipídios.

Conclui-se, portanto, que as PCRs estudadas apresentaram total concordância com os resultados da hemaglutinação em sangue de homens e mulheres Rh positivo e negativo. Desta forma, podem ter aplicação imediata para

genotipagem *RhD* do sangue de grávidas Rh negativo e seus parceiros. Além disso, têm utilidade no seguimento de gestantes Rh negativo isoimunizadas ou não. Na primeira situação, a análise de produtos de biópsia de vilo corial, amniocentese ou cordocentese podem ser genotipados rapidamente e com alta acurácia para a melhor condução obstétrica caso haja indicação para estes procedimentos. Dessa forma, poupam-se 40% das pacientes com fetos Rh negativo de intervenções mais agressivas, caracterizando estas gestações como de risco habitual e, conseqüentemente, trazendo bem estar psicológico para a família envolvida. Para as pacientes não isoimunizadas em que, após abortamento ou prenhez ectópica, não foram coletadas amostras sangüíneas para realização da hemaglutinação ou para aquelas que porventura venham a necessitar de diagnóstico invasivo, a PCR convencional definirá de forma acurada se há necessidade de realização de imunoglobulina anti-D profilática. Nesta situação, haverá redução de 40% no consumo das imunoglobulinas anti-Rh, gerando redução do risco de transmissão de doenças virais ou *prions* ainda não triados pelos bancos de sangue, economia financeira, além de não se depletar o já escasso estoque destes hemoderivados provenientes de doações de indivíduos Rh sensibilizados, existentes em número cada vez menor.

Frente aos resultados deste trabalho é possível vislumbrar que os próximos projetos nesta área deverão focar o estudo de materiais embrio-fetais resultantes de abortamentos, de prenhezes ectópicas, da biópsia das vilosidades coriônicas e líquido amniótico obtido por meio de amniocentese. No entanto, não se pode perder de vista a necessidade de avanços na pesquisa de DNA fetal livre na circulação materna e no diagnóstico pré-implantacional, ambos demandando um aumento da sensibilidade da PCR convencional. Adicionalmente, ainda segundo dados da

literatura, a PCR em tempo real parece suprir esta deficiência, sendo então necessário a realização de estudos populacionais nos serviços de atenção obstétrica onde esta metodologia venha a ser introduzida e, também, com o intuito de preencher as atuais lacunas do conhecimento, como por exemplo para definição da reprodutibilidade nas populações de etnia diversa da caucasiana.

8 – CONCLUSÃO

A genotipagem *RhD* utilizando a reação em cadeia da polimerase convencional no sangue de indivíduos Rh positivo e negativo é um procedimento prático, rápido e de elevada acuracidade.

Quando comparado com a hemaglutinação, o uso da PCR para diagnóstico do fator Rh mostrou sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de 100%.

*9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

* Referências bibliográficas seguindo as normas do *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver Style) – Grupo de Vancouver.

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27(5):415-18.

Baiochi E, Camano L, Sass N, Colas OR. Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO e *RhD* em puérperas e seus recém-nascidos. *Rev Assoc Med Bras.* 2007;53(1):44-6.

Barros C, Otta M, Wakim VL, Zaqueroni M, Baleotti Júnior W, Castilho L. Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006;28(4):269-74.

Bennett PR, Kim CL, Colin Y, Warwick RM, Chérif-Zahar B, Fisk NM, et al. Prenatal determination of fetal *RhD* type by DNA amplification following chorion villus biopsy or amniocentesis. *N Engl J Med.* 1993;329:607-10.

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, Demaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):705-8.

Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med.* 1998;26:175-85.

Bianchi DW. Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential—A Review. *Placenta.* 2004;25(Suppl):S93-S101.

Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquéz-Do D, Moise KJ, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal *RhD* status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Invest.* 1999;6(2):64-9.

Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, *et al.* Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update.* 2002;8:493-500.

Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update.* 2005;11(1):59-67.

Blazer S, Zimmer EZ, Gover A, Bronshtein M. Fetal omphalocele detected early in pregnancy: associated anomalies and outcomes *Radiology.* 2004;232(1):191-5.

Boon EMJ, Schlecht HB, Martin P, Daniels G, Vossen RHAM, Dunnen JT, Bakker B, Elles R. Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007;27(10):932-7.

Cavallotti D, Casilla G, Piantelli G, Verrotti C, Fieni S, Gramellini D. Early complications of prenatal invasive diagnostics: perspective analysis. *Acta Biomed Ateneo Parmense.* 2004;75(1):23-6.

Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, *et al.* Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med.* 1996;2:1033-5.

Chilcott J, Lloyd Jones M, Wight J, Forman K, Wray J, Beverley C. A review of the clinical effectiveness and cost effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are Rhesus (*RhD*) negative. London: National Institute of Clinical Excellence, 2002.

Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of α -thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*. 2002;360:998-1000.

Contreras M. The prevention of Rh haemolytic disease of the fetus and newborn - general background. *BJOG*. 1998;105:7-10.

Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 2, 2008a. Oxford: Update Software.

Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 2, 2008b. Oxford: Update Software.

Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC, Hauth JC, Wenstrom KD. *Williams Obstetrics*. 22st ed. McGraw-Hill; 2005. Diseases and injuries of the fetus and newborn; p. 649-91.

Daniels G, Van Der Schoot CE, Olsson ML. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sanguinis*. 2005;88:136–42.

Denomme GA, Fernandes BJ. Fetal blood group genotyping. *Transfusion*. 2007;47:64S-68S.

Duarte G, Cunha SP, Mauad Filho F, Nogueira AA, Berezowski AT, Rodrigues R. *Protocolo de Condutas em Gestação de Alto Risco*. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 2003.

Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, Von Dem Borne AEG JR, Van Der Schoot CE. Detection of fetal *RHD*-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*. 1998;352:1196.

Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:877-91.

Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab*. 2002;48:53-9.

Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput *RhD* typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-*RhD* immunoglobulin in *RhD* negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*. 2008;336:816-8.

Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood – A meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:1163-73.

Gerovassili A, Garner C, Nicolaides KH, Thein SL, Rees DC. Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities? *Prenat Diagn.* 2007;27:104–110.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky HJ, White TJ. *PCR Protocols; a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press, 1990.

Johnson L, Mccracken AS, Morris JM, Woodland NB, Flower RL. Variation in the reliability of *RHD* antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exons of the *RHD* gene. *Vox Sang.* 2003;85:222-3.

Kolialexi A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Mavroua A. Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1022:113-8.

Levi JE, Wendel S, Takaoka DT. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2003;25(9):687-90.

Liu FM, Wang XY, Feng X, Wang W, Ye YX, Chen H. Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obst Gynecol Scand.* 2007;86:535-41.

Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1989;2:1363-5.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-7.

Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Poon PM, Wainscoat JS, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998a;62:768-75.

Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal *RhD* status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 1998b;339:1734-8.

Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem*. 1999a;45:1747-51.

Lo YM. Fetal *RhD* genotyping from maternal plasma. *Ann Med*. 1999b;31(5):308-12.

Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(3):293-6.

Machado IN, Castilho L, Pellegrino Jr J, Barini R. Fetal *RhD* genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(4):232-5.

Maron JL, Bianchi DW. Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress. *Am J Med Genet Part C (Seminars in Medical Genetics)*. 2007;145C:5–17.

Moise, KJ. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2002;100:600-11.

Monard MC, Baranauskas JA. *Sistemas Inteligentes, Fundamentos e Aplicações*; capítulo 4: Conceitos sobre aprendizado de máquina. Barueri, SP: Ed. Manole, 2003.

Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, Deboni E, Firgaira FA, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet*. 1990;336(8709):197-200.

National Blood. In: Guidelines on the prophylactic use of Rh D immunoglobulin (anti-D) in obstetrics. Canberra, ACT: NHMRC, 2003.

Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang*. 2001;80:112-6.

Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific *primers* (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39:225-35.

Pereira JC, Couceiro AB, Cunha EM, Machado AI, Tamagnini GP, Martins NP, et al. Prenatal determination of the fetal *RhD* blood group by multiplex PCR: a 7-year Portuguese experience. *Prenat Diagn*. 2007;27(7):633-7.

Piatetsky-Shapiro G, Frawley W. Knowledge discovery in databases. AAAI/MIT Press, 1991.

Ramos ES. Cell-Free fetal DNA in maternal plasma and noninvasive prenatal diagnosis. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2006;14(6):964-7.

Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, Van Der Smagt JJ, Van Der Schoot CE, De Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol*. 2004;103(1):157-64.

Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single gene disorder from maternal plasma. *Lancet*. 2000;356:1170.

Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen uber Puerperal Eklampsie. Leipzig, Vogel, (1893). Apud Attwood HD, Park WW. Embolism to the lungs by trophoblast. *Br J Obstet Gynaecol*. 1961;68:611-7.

Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(6):747-64.

Siva SC, Johnson SI, Mccracken AS, Morris JM. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2003;43:10-5.

Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn.* 1995;15(7):641-6.

Van Den Veyver IB, Moise KJ. Fetal *RhD* typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *Obstet Gynecol.* 1996;88(6):1061-7.

Van Der Schoot CE, Martine Tax GH, Rijnders RJP, De Haas M, Christiaens GCML. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. *Transfus Med Rev.* 2003;17(1):31-44.

Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet.* 1969;1:1119-22.

Weiner CP. Use of cordocentesis in fetal hemolytic disease and autoimmune thrombocytopenia. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;162:1126-8.

Weiner CP, Okamura K. Diagnostic fetal blood sampling technique related losses. *Fetal Diagn Ther.* 1996;11:169-75.

Weiss SM, Kulikowski CA. Computer systems that learn. San Francisco, CA: Morgan Kaufmann Publishers Inc., 1991.

Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. BJOG. 2000;107:766-9.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. NOME DA PESQUISA: “**Diagnóstico do fator *RhD* fetal utilizando o sangue materno**”
2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Conrado M. Coutinho
Prof. Geraldo Duarte
Profa. Ester S. Ramos
3. PROMOTOR DA PESQUISA: Hospital das Clínicas da FMRP-USP
4. TELEFONE PARA CONTATO: (16) 3602-2583
5. ESCLARECIMENTOS: O diagnóstico pré-natal é muito importante para o seguimento da gravidez. Algumas doenças podem ser tratadas com o nenê ainda dentro do útero da mãe e outras logo após o nascimento. Algumas doenças comuns em certas famílias são conhecidas como de causa genética e podem afetar apenas bebês do sexo masculino ou feminino. Já as pacientes que são do grupo sanguíneo Rh negativo correm o risco de desenvolver uma doença que pode prejudicar a saúde do bebê ainda dentro do útero e após o nascimento, o que é chamado isoimunização Rh. Nesta pesquisa, através dos resultados de alguns exames que não afetam a saúde do bebê, poderemos conhecer o sexo e o grupo sanguíneo dos filhos de pacientes grávidas e se saberá quais precisarão de tratamento. Além disso, poderá ser dada depois uma melhor orientação para elas e seus parentes. Realizaremos, também, o mesmo estudo em homens e mulheres não grávidas, para saber se o sexo e a gestação interferem com os exames realizados. O estudo não trará nenhuma despesa para você. Você pode auxiliar neste trabalho através de um pouco de sangue (colhidos como qualquer exame de rotina). Todo esse material será usado para estudar a sua constituição genética através do DNA (mas não será utilizado para outros fins, que não esta pesquisa, sem um novo consentimento). Esta é uma técnica ainda em fase experimental.
5. Informações adicionais: você receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo. A segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à sua privacidade. O compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a sua vontade de continuar dele participando. O compromisso de que você será devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de sua participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu _____ RG n° _____,
abaixo assinado, concordo com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do projeto de pesquisa “**Diagnóstico do fator *RhD* fetal utilizando o sangue materno**”.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura da paciente

Assinatura dos pesquisadores

Apêndice B – Questionário**Ficha de Paciente**

Nome: _____
Reg. HC: _____ Data: _____
Nasc. Paciente: _____ Nasc. Marido: _____
Endereço: _____
Telefone: _____
Tipo Sanguíneo: _____
G ___ P ___ A ___ C ___
Filhos: ___ Idade e sexo: _____
Datas dos abortos: _____
Pré-eclâmpsia/eclâmpsia ou hipertensão? ___ Quando: _____
Historia na família? _____
Tentativas de RA _____

Gestação atual
Natural ___ Hiperovulação ___ FIV ___ ICSI ___ Outras _____
Data TE _____
DUM _____
Idade Gestacional (US) _____

OBS.:

Apêndice C – Matriz de confusão utilizada na análise estatística

Tabela 7. Análise estatística da performance da PCR convencional em comparação com os resultados da hemaglutinação para a detecção do fator Rh.

Classe Observada (Hemaglutinação)	Classe Predit (PCR: <i>RhD</i>)		Total
	Positivo	Negativo	
<i>RhD</i> Positivo	11	0	11
<i>RhD</i> Negativo	0	12	12
Total	11	12	23

Medida	Sigla	Fórmula	Resultado
Verdadeiro Positivo	TP		11
Verdadeiro Negativo	TN		12
Falso Positivo	FP		0
Falso Negativo	FN		0
Total Preditos Positivos	L		11
Total Preditos Negativos	lt(tração)		12
Total Observados Positivos	r		11
Total Observados Negativos	rt(tração)		12
Total	n		23
Valor Preditivo Positivo	VPP	$TP/(TP+FP)$	100%
Valor Preditivo Negativo	VPN	$TN/(TN+FN)$	100%
Sensibilidade	Sens	$TP/(TP+FN)$	100%
Especificidade	Spec	$TN/(TN+FP)$	100%
Precisão Total	Tacc	$(TP+TN)/n$	100%

ANEXO

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO <i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>	Protocolo HCRP/CEP Mina BR/2006 2005/2006
Fone: (16) 3602-2228 / Fax: (16) 3633-1144 cep@hcrp.fmrp.usp.br www.hcrp.fmrp.usp.br		Campus Universitário - Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Ribeirão Preto, 24 de maio de 2006

Ofício nº 1436/2006
CEP/SPC

Prezado Professor:

O trabalho intitulado **"DIAGNÓSTICO DO FATOR RhD FETAL UTILIZANDO O SANGUE MATERNO"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 225ª Reunião Ordinária realizada em 22/05/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 15501/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. GERALDO DUARTE
CONRADO MILANI COUTINHO (Orientando)
Depto. de Ginecologia e Obstetria
Em mãos